

PCT/DE 99/03432
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	18 JAN 2000
WIPO	PCT

DE 99/3432

Bescheinigung

4

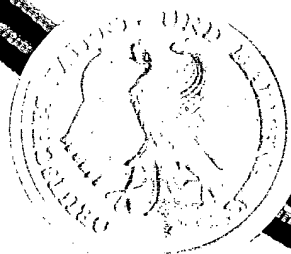
Das Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

„Neue Expressionskassette zur Expression von beliebigen
Genen in Pflanzensamen“

am 4. November 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
A 01 H und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.



München, den 13. Dezember 1999
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 52 195.2

Agurks



2

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen und die die Expressionskassette enthaltenden Plasmide. Die Erfindung schließt die Herstellung transgener Pflanzenzellen, die diese Expressionskassette enthalten, sowie die Verwendung der Plasmide in dieser Expressionskassette zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit ein. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Pharmazie und die Pflanzenproduktion.

Die Erfindung hat das Ziel, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, eine Expressionskassette zu konstruieren, mit der eine stabile Expression mit hoher Expressionsrate von Genen der herzustellenden Stoffe in Pflanzensamen erreicht werden kann.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette enthält folgende wesentlichen Bestandteile:

- den Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins
- die DNA-Sequenz des SBP-Signalpeptids
- ein zu exprimierendes Gen
- 3'-Terminationssequenzen

Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
Gatersleben

Dr. U. Heim, Dr. H. Weber

Neue Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in
Pflanzensamen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen und die die Expressionskassette enthaltenden Plasmide. Die Erfindung schließt die Herstellung transgener Pflanzenzellen, die diese Expressionskassette enthalten, sowie die Verwendung der Plasmide in dieser Expressionskassette zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit ein. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Biotechnologie, die Pharmazie und die Pflanzenproduktion.

Seit langem gibt es Methoden, die es ermöglichen, relevante Gene in das Genom höherer Pflanzen einzuschleusen. Ziel dieser Arbeiten ist die Herstellung von Pflanzen mit neuen Eigenschaften, zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktion, der Optimierung der Lebensmittelherstellung und der Produktion bestimmter Pharmazeutika und anderer interessanter Inhaltsstoffe. Eine Voraussetzung für die Expression der übertragenen Gene ist dabei, daß sie über pflanzenspezifische Promotorsequenzen verfügen. So werden dazu bereits sogenannte konstitutive Promotoren wie der Promotor des Nopalinsynthase - Gens /1/, der TR - Doppelpromotor /2/ oder der Promotor des 35S - Transkriptes des Blumenkohl - Mosaikvirus /3/ verwendet. Ein Nachteil dieser Promotoren ist es, daß sie in fast allen Geweben der manipulierten Pflanzen aktiv sind. Dadurch ist eine kontrollierte und gezielte Expression der Fremdgene in den Pflanzen nicht möglich. Es ist besser, Promotoren zu benutzen, die gewebespezifisch und entwicklungsabhängig funktionieren. So wurden Gene mit den dazu gehörigen Promotoren isoliert, die nur

in Antheren, Ovarien, Blüten, Blättern, Laubblättern, Stengeln, Wurzeln oder Samen aktiv sind /4/. Sie unterscheiden sich aber sehr in der Stärke und Spezifität der Expression und sind nur begrenzt einsetzbar. Für die Nutzung der Samen als Ernährungsquelle und zur Produktion von Inhaltsstoffen sind vor allem die samenspezifischen Promotoren von großem Interesse. Durch die langjährige Erforschung der Gene der Samenspeicherproteine stehen schon einige mehr oder weniger spezifische und in der Stärke unterschiedliche Promotoren, wie beispielsweise des Phaseolins /5/ oder des Legumins und USP /6/ zur Verfügung. Da diese Speicherproteine von Genfamilien synthetisiert werden, stehen Fusionen solcher Promotoren mit Fremdgenen in Konkurrenz zu den endogenen zahlreichen Genen der entsprechenden Genfamilie. Deshalb ist es günstiger, Promotoren von unikal, stark und spezifisch exprimierenden Genen zu benutzen. Für Ko- und Mehrfachtransformationen ist die Verwendung verschiedener regulatorischer Sequenzen angebracht, um die zeitliche Entwicklung des Samens besser auszunutzen, parallel gleiche oder verschiedene Genprodukte zu synthetisieren und um Kosuppression zu vermeiden.

Obwohl also bereits mehrere Expressionskassetten zur Expression beliebiger Gene in Pflanzensamen bekannt sind, waren die erreichten Expressionsraten in Pflanzensamen bisher noch nicht optimal, um darauf eine pflanzenbiotechnologische Produktion der gewünschten Stoffe zu begründen.

Die Erfindung hat daher das Ziel, die samenspezifische Expression in transgenen Pflanzen auf eine für eine Stoffproduktion geeignete Basis zu stellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, eine Expressionskassette zu konstruieren, mit der eine stabile Expression mit hoher Expressionsrate von Genen der herzustellenden Stoffe in Pflanzensamen erreicht werden kann.

Die Zielstellung der Erfindung wird mit der in Anspruch 1 beschriebenen Expressionskassette erreicht, die Unteransprüche 2-7 sind Vorzugsvarianten.

Die erfindungsgemäße Expressionskassette enthält folgende wesentlichen Bestandteile:

- den Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins
- die DNA-Sequenz des SBP-Signalpeptids
- ein zu exprimierendes Gen
- 3'-Terminationssequenzen

Die Erfindung bezieht sich vor allem auf eine unikal im Genom vorkommende regulatorische DNA - Sequenz, die eine starke Expression eines beliebigen heterologen Gens im wesentlichen in den Keimblättern und im Endosperm von Samen entwicklungsabhängig vermittelt.

Der wichtigste Bestandteil der Kassette ist der SBP-Promotor, dessen Sequenz in der Abb. 1 dargestellt ist.

Dieser Promotor hat gegenüber analogen Promotoren auf diesem Gebiet den Vorteil großer Stärke und Samenspezifität.

Die Expressionskassette enthält neben den transkriptionell regulatorischen Sequenzen auch ein Signalpeptid, welches den Transport des gewünschten Genproduktes in die Proteinkörper ermöglicht und so einen Abbau der Genprodukte weitgehend verhindert. Die wahlweise Nutzung des authentischen Signalpeptids ermöglicht den Transport des synthetisierten Fremdproteins zu und die Lagerung in den Proteinbodies.

Die zu exprimierenden Gene können entweder als Transkriptions- oder als Translationsfusionen integriert sein, sie können weitgehend variiert werden, beispielsweise können Gene für die Produktion von Enzymen (z.B. Amylase, Xylanase), pharmazeutischer Produkte oder für die Überexpression von Proteinen mit einem hohen Anteil essentieller Aminosäuren (z.B. methioninreiches 2S Globulin der Brasilnuß) oder anderer die Eigenschaften der Samen beeinflussender Proteine eingesetzt werden. Weitere Möglichkeiten liegen in der Reduzierung oder im Ausschalten von Genprodukten durch die Integration von Genen in antisense Orientierung. Durch den Einbau regulatorischer Gene unter Kontrolle dieses samenspezifischen Promotors können auch

Stoffwechselprozesse im Samen beeinflusst werden. Die Kassette kann ebenfalls benutzt werden, um das dem Promotor eigene SBP Gen aus der Ackerbohne in anderen Spezies zu exprimieren. Die Nutzung anderer Terminatoren, so zum Beispiel die Terminationssequenz des zu exprimierenden Gens, ist eine weitere Möglichkeit, um die Kassette optimal einzusetzen. Als konkretes Beispiel wurde das Gen der β -Glucuronidase (GUS) genutzt, um die Spezifität des Promotors zu zeigen (Abb. 2b,c).

Die Nukleotidsequenz der Expressionskassette enthält transkriptional regulatorische Bereiche, die eine starke spezifische Expression eines beliebigen Gens in den Samen von Pflanzen gewährleistet. Der Northern (Abb. 2a) zeigt die hohe samenspezifische Expression in den verschiedenen Geweben von *Vicia faba*. Die GUS-Daten in den Abb. 2b und 2c zeigen zum einen in den Schnitten durch reifen Tabaksamen die Verteilung der β -Glucuronidase und zum anderen die entwicklungsabhängige Akkumulation der β -Glucuronidase in den transgenen Tabaksamen. Unter Schutz gestellt werden auch die Plasmide, welche die Expressionskassette enthalten, bevorzugt die Plasmide pSBPROCS und pPTVSBPRGUS.

Zum Umfang der Erfindung gehört auch die Verwendung der Expressionskassette gemäß Ansprüchen 12-16, die durch Transformation in Bakterienstämme und anschließendem Transfer der entstandenen rekombinanten Klone in vorzugsweise dicotyle Pflanzen erfolgt. Die das gewünschte Genprodukt im Samen exprimierender Pflanzen werden selektiert und als genetisch stabile Linien gezüchtet. Nach der Ernte werden dann die gewünschten Genprodukte aus den transgenen Samen in an sich bekannter Weise extrahiert.

Diese Erfindung ist auch interessant für Anwendungen, wo das gewünschte Genprodukt unter der Kontrolle verschiedener Promotoren exprimiert wird, um die Expressionsraten in der Summe zu erhöhen, um den Entwicklungszeitraum der Samen besser zu nutzen und um Effekte durch Kosuppression zu vermeiden. Für Ko- und Mehrfachtransformationen mit dem Ziel, verschiedene Genprodukte zu exprimieren, ist diese Expressionskassette

5

ebenfalls geeignet. Für diese Strategien benötigt man eine Vielzahl neuartiger Expressionskassetten, um die richtigen auswählen zu können.

Das gesamte Verfahren zur Veränderung einer Pflanzenzelle wird an einem Beispiel (pSBPOCS S.6) dargestellt.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Methoden

1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung wurden die Vektoren pUC18 /7/, pBK-CMV (Stratagene) und pOCS1 (Plant Genetic Systems, Gent, Belgien). Für die Pflanzentransformation wurden die Vektoren BIN19 /8/, sowie nach Deletion des GUS Gens pGPTV-BAR /9/, verwendet.

2. Bakterienstämme

Für die Transformation in E. coli wurde der Stamm DH5 α /10/ verwendet. Durch Konjugation wurden die Binärplasmide in den Agrobakterienstamm EHA105 /11/ eingeführt.

3. Pflanzentransformation

Die Transformation von Nicotiana tabaccum erfolgte durch die Blattscheibchenmethode /12/ und die Transformation von Vicia narbonensis mit Hilfe der von Pickardt 1991 beschriebenen Methode /13/ über Agrobakterien vermittelten Gentransfer.

4. Analyse genomischer DNA aus transgenen Pflanzen

Die genomische DNA der transgenen Tabak und V. narbonensis Pflanzen wurde mit Hilfe des DNA - Isolierungskit der Firma Macherey & Nagel isoliert. In einem ersten Schritt wurden die transgenen Linien über PCR mit genspezifischen Primern identifiziert. Die Integration der Fremd-DNA wurde mittels "Southernblot" - Analysen von 20 μ g DNA nach geeigneter Restriktionsspaltung untersucht.

5. β -Glucuronidase - Aktivitätstest (GUS - Assay)

Das Reporter-gen β -Glucuronidase ist ein bakterielles Enzym, das sowohl quantitativen /14/ als auch histochemischen Aktivitätsbestimmungen zugänglich ist. Gewebeproben wurden in 1mM X-Gluc, 50mM Na-Phosphat (pH 7,0) und 0,1% Tween 20 über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Schnitte wurden die Gewebe fixiert, in Paraffin eingebettet und am Mikrotom auf 15 - 30 μ m Schnittstärke geschnitten.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung, die die Herstellung einer neuen samenspezifischen Expressionskassette enthält sowie die sich daraus ableitenden Plasmide und transgenen Pflanzen, wird nachstehend - zum Teil an Hand von den Abbildungen - an einem Ausführungsbeispiel erläutert.

1.) Klonierung und Strukturanalyse eines SBP - Samenprotein - Gens aus *Vicia faba*

Von der Sequenz eines cDNA Klons, der für das Saccharosebindeprotein aus der Sojabohne kodiert /15/, wurden Primer (5'-GAAGACCCTGAGCTCGTAACTTGCAA-ACAC-3' und 5'-AGTACTCATAGATCTCTGGGTGATGTTGGT-3') abgeleitet. Mittels RT - PCR an mRNA, isoliert aus unreifen Kodyledon von *V. faba*, wurde dann die genspezifische Sonde amplifiziert, kloniert und sequenziert. Das PCR - Produkt wurde als dem Saccharosebindeprotein homologes Genfragment identifiziert und diente als Sonde für die Isolierung der vollständigen cDNA aus einer Kodyledon spezifischen λ Zap Express cDNA Bank aus *V. faba* L. var. minor. Einer der isolierten Klone (VfSBP20), der auf Nukleotidebene eine Homologie von 68% hat, kodiert für das vollständige SBP homologe Gen aus der Ackerbohne. Es unterscheidet sich aber sowohl in der Expression (Abb.2a) als auch in der Funktion (keine Saccharosebindung) von dem aus der Sojabohne isoliertem Gen.

17.04.1990

2) Isolierung der regulatorischen Sequenzen mittels PCR

Die regulatorischen Sequenzen wurden mit Hilfe des "Universal GenomeWalker™ Kit" der Firma CLONTECH und den genspezifischen Primern PSBP1, Position 159 (5'-AATCCTCA-CACTTCTCCATGCATATCCGTTTGTCC-3'), PSBP2, Position 118 (5'-GCCCTGCAGAT-CGCATTTGTCTTTGCA-3') und PSBP3, Position 85 (5'-CTGGGTCCTTTTCTTTTCTGG-C-3') isoliert. Nach vorheriger Spaltung der genomischen DNA von *V.faba* mit ScaI (a) bzw. StuI (b) und Ligation der Adaptoren wurde entsprechend der Beschreibung des Kits eine Zweischritt - PCR nach folgenden Parametern durchgeführt: 7 Zyklen a' 94°C, 2s, 72°C, 3 min und 32 Zyklen a' 94°C, 2s, 67°C, 3 min und 4min 67°C. Die PCR - Ansätze wurden 1:50 verdünnt und jeweils 1µl in einer zweiten PCR (5 Zyklen a' 94°C, 2s, 72°C, 3 min und 20 Zyklen a' 94°C, 2s, 67°C und 4min bei 67°C amplifiziert. Im Agarosegel konnten Banden von 1,7kb aus (a) und 1,9kb aus (b) über einen Southernblot verifiziert werden. Diese Banden wurden dann in den pUC18 kloniert und sequenziert. Die Klone SBPR7 und SBPR15 konnten dann durch Sequenzvergleich als die zum Gen VfSBP20 zugehörigen Promotoren identifiziert werden. Sie stellen allelische Varianten des Gens VfSBP20 dar, wobei beide Klone 100% Sequenzidentität im entsprechenden Bereich zum Klon VfSBP20 aufweist. 5'seitig vom ATG des SBP Gens sind mit dem Klon SBPR7 1539bp und mit dem Klon SBPR15 1750bp isoliert worden. Sie unterscheiden sich durch 23 Basenpaarsubstitutionen und zwei Insertionen. Die Restriktionskarte der Klone pSBPR7 und pSBPR15 sind in Abb. 3, die Sequenz des Klons pSBPR15 ist in Abb. 1 wiedergegeben.

3a) Nachweis der samenspezifischen Expression in Tabak

Mit Hilfe des Reportergens der β -Glucuronidase sollte die samenspezifische Expression der isolierten regulatorischen Sequenzen SBPR7 und SBPR15 überprüft werden. Dazu wurde das Binärplasmid pBI101 /14/, welches das promotorlose Glucuronidase Gen hinter einem Polylinker enthält, mit SmaI geschnitten und dephosphoryliert. Aus den Plasmiden pSBPR7 bzw. pSBPR15 wurden mittels einer SalI/NcoI Spaltung die Promotoren isoliert und die Enden geglättet. Die Fragmente wurden dann in den SmaI - Ort des Binärplasmides pBI101 vor das Reportergen kloniert, wobei die

Plasmide pBISBPR7GUS und pBISBPR15GUS entstanden sind. Diese Plasmide wurden dann in den Agrobakterienstamm EHA105 transferiert und die chimären SBP-Promotor/Glucuronidase Gen enthaltenen Agrobakterien für die Transformation von Tabak eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Figur 2b und 2c abgebildet. Die Analyse der transgenen Tabaksamen zeigt eine starke Blaufärbung und damit eine starke Aktivität der Glucuronidase im Endosperm und in den Keimblättern der Tabaksamen auch entsprechend der Samenentwicklung. In anderen Geweben konnte keine Glucuronidaseaktivität nachgewiesen werden. Auch unterschieden sich die beiden leicht verschiedenen Nukleotidsequenzen SBPR7 und SBPR15 nicht in ihrem Expressionsverhalten. Diese Daten zeigen, daß die isolierten regulatorischen Sequenzen, die mit dem β -Glucuronidase Gen fusioniert wurden, eine starke und streng samenspezifische Expression im Tabak vermitteln.

3b) Nachweis der samenspezifischen Expression in der Erbse
Um zu zeigen, daß auch in den Leguminosen mit einer samenspezifischen Expression zu rechnen ist, wurde das SallI/NcoI Fragment des Plasmids pSBPR15 in das SallI/NcoI geschnittene Plasmid pGUS1 (Plant Genetic Systems, Gent) kloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pSBPGUS wurde mit SallI/SmaI die Fusion des SBPR15 Promoters/GUS/ocs-Terminator ausgeschnitten, geglättet und in das Binärplasmid pPTV-Bar, SmaI geschnitten, ligiert (Abb.4). pPTV-Bar /9/ ist ein Phosphinithricin-Resistenz vermittelndes Binärplasmid, welches erfolgreich für die Transformation von Erbsen eingesetzt wird. Dieses Plasmid wurde pPTVSBPRGUS (Abb.4) genannt.

4.) Herstellung der Expressionskassette zur Überexpression von heterologen Genen in Samen

Um die regulatorischen Sequenzen für die Überexpression von Fremdgenen verfügbar zu machen, wurde das SallI Fragment des längeren Klons SBPR15 isoliert und geglättet und in den SmaI Ort des Plasmides pOCS1 (Plant Genetic Systems, Gent, Belgien) kloniert. Diese Kassette enthält somit die Promotorregion, die vollständige 5' untranslatierte Region, das vollständige

10.11.90

Signalpeptid, die ersten fünf Triplets des reifen Proteins (Abb. 1) und den 3' untranslatierten Bereich mit den Polyadenylierungssignalen des Octopin Synthase Gens (Fig.5). Für Transkriptionsfusionen mit Fremdgenen kann der NcoI-Ort, für Translationsfusionen der BamHI-Ort und der XbaI-Ort genutzt werden. Nach erfolgter Insertion des Fremdgens wird die den Promoter, regulatorische Sequenzen, das Fremdgen und die 3'-Terminationssequenzen enthaltene Sequenz mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in einen Binärvektor mit der für die Pflanzentransformation geeigneten Herbizidresistenz kloniert.

Literatur:

1. Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) *Nature*, 303, No. 5914, 209-213.
2. Velten, J., Velten, L., Hani, R. and Schull, J. (1984) *EMBO J.* 3, 2723-2730.
3. Koziel, M.G., Adams, T.L., Hazlet, M.A., Damm, D., Miller, J., Dahlbeck, D., Jayne, S. and Staskawicz, B.J. (1984) *Journ. of Molec. and Appl. Genet.* 2, 549-562.
4. Goldberg, R.B. (1986) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B314, 343-353.
5. Hall, T. C. et al (1996) US Patent 5,504,200
6. Conrad, U. et al. (19--) deutsches Patent DE 196 04 588.6
7. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) *Gene*, 33, 103-119.
8. Bevan, M. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 8711-8720.
9. Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. (1992) *Plant Mol. Biol.* 20, 1195-1197.
10. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
11. Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Hoekema, A. (1993) *Transgenic. Res.* 2, 208-218.
12. Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Bassüner, R., Van Montagu, M., Inze, D. and Wobus, U. (1991) *Mol Gen. Genet.* 225, 459-467.
13. Pickardt, T., Meixner, M., Schade, V. and Schieder, O. (1991) *Plant Cell Report*, 9, 535-538.
14. Jefferson, R.A. (1987) *Plant Molec. Biol. Rep.* 5, 387-405.
15. Grimes, H.D., Overvoorde, P.J., Ripp, K., Franceschi, V.R. and Hitz, W.D. (1992) *The Plant Cell*, 4, 1561-1574.

1: 00:11:00

Patentansprüche

1. Neue Expressionskassette zur Expression von beliebigen Genen in Pflanzensamen bestehend aus
 - dem Promotor des Gens des Saccharosebindeprotein (SBP)-ähnlichen Samenproteins
 - der DNA-Sequenz des SBP-Signalpeptids
 - einem zu exprimierenden Gen
 - 3'-Terminationssequenzen
2. Expressionkassette nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie den SBPR-Promotor mit der Sequenz entsprechend Abb.1. enthält.
3. Expressionkassette nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der mit einer transkriptional regulatorischen Sequenz für eine starke samenspezifische Genexpression versehenen DNA - Region eine weitere DNA Sequenz nachgeschaltet ist, die die Information für die Bildung und mengenmäßige Verteilung endogener Produkte oder die Expression heterologer Produkte in Kulturpflanzen enthält.
4. Expressionkassette nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß beliebige Fremdgene entweder als Transkriptions- oder als Translationsfusionen integriert sind.
5. Expressionkassette nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid des SBP - Samenprotein - Gens als Signalpeptid verwendet wird.
6. Expressionskassette nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als das zu exprimierende Gen das Gen des Saccharosebindeprotein verwandte Gen eingesetzt wird.
7. Expressionskassette nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß sie auch für Ko- und Mehrfachtransformationen eingesetzt wird.

12

8. Plasmide enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1-5.

9. Plasmid pSBPROCS, bestehend aus einer etwa 5,3kb großen DNA Sequenz, in der ein etwa 1,9kb großes SalI - Promoterfragment des regulatorischen Starterbereichs inklusive des Signalpeptides und 5 Tripletts des SBP homologen Gens aus Vicia faba, Restriktionsorte zum Einklonieren von Fremdgenen und der Transkriptionsterminator des Octopinsynthasegens enthalten sind.

10. Plasmid pPTVSBPRGUS, bestehend aus einer ca. 14,9kb großen DNA-Sequenz, in der ein etwa 1kb großes Phosphinothricin - Resistenzgen, ein etwa 1,8kb großes SalI/NcoI-Promoterfragment des regulatorischen Starterbereichs des SBP homologen Gens aus Vicia faba, die etwa 2kb große kodierende Region der β - Glucuronidase und der Transcriptionsterminator des Octopinsynthasegens enthalten sind.

11. Verfahren zur Einführung einer Expressionskassette mit einer DNA-Sequenz zur starken samenspezifischen Genexpression in eine Pflanzenzelle, das folgende Schritte beinhaltet:

- a) Isolation des Klons VfSBP20, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen, welches für das in Pflanzensamen vorkommende SBP - Samenprotein kodiert, aus einer cDNA Bank von Kotyledonen von Vicia faba selektiert wird,
- b) Isolation des Klons pSBPR15, dadurch gekennzeichnet, daß die darin enthaltende DNA Sequenz die regulatorische Starterregion des SBP - Samenprotein - Gens aus Vicia faba enthält,
- c) Herstellung des Plasmids pSBPOCS unter Verwendung des 1,9kb großen SalI Fragments des Plasmid pSBPR15.
- d) Integration von Fremdgenen in die Expressionskassette pSBPOCS,
- e) Klonierung der Expressionskassette, die eine DNA-Sequenz enthält zur Überexpression von Fremdgenen in Pflanzensamen, in Binärvektoren

13 05 1993

- f) Transfer der Expressionskassette, die ein Fremdgen unter der Kontrolle des SBPR Promoters enthält, in eine Pflanzenzelle.
12. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1-7 zur Expression homologer und heterologer Gene in Samen transformierter Pflanzen.
13. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1-7 zur Expression von Genen, die die Lagereigenschaften oder die Keimfähigkeit von Samen verändern.
14. Verwendung der Plasmide pBISBPR7, pBISBPR15, pSBPGUS, pPTVSBPRGUS und pSBPOCS oder Derivate davon zur Transformation von Kulturpflanzen.
15. Verwendung der Plasmide pBISBPR7, pBISBPR15, pSBPGUS, pPTVSBPRGUS und pSBPOCS oder Derivate davon zur Regulation endogener Prozesse oder zur Herstellung heterogener Produkte in Kulturpflanzen.
16. Verwendung einer Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die transformierten Pflanzen, die im Samen veränderte oder neue Genprodukte exprimieren, selektiert, genetisch stabile Linien gezüchtet und die Genprodukte aus den Samen der transgenen Pflanzen extrahiert werden.
17. Pflanzenzelle, enthaltend ein Plasmid gemäß Anspruch 8 - 10.
18. Pflanzenzelle, hergestellt nach dem Verfahren des Anspruchs 11.
19. Pflanze oder pflanzlicher Gewebe, regeneriert aus einer Pflanzenzelle gemäß der Ansprüche 12 oder 13.
20. Pflanze gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Kulturpflanze ist.

Abb. 1

Abb.1

ATCCAACCTTCTGATCTTTGAATCTCTGTTCCAACATGTTCTGAAGGAGTTCTAAGACTTTTCAGAAAGCTTGTAAACAT
GCTTTGTAGACTTTCTTTGAATTACTCTTGCAAACCTCTGATTGAACCTACGTGAAAACTGCTCCAGAAAGTTCTAACC
TTCCGCTCTGGGAAGGCCAAAATTTATGAGTACTTCAGTTTCATGGACGTGCTTCAAAGATTTATAACTTGAAATCC
CATCATTTTAAAGAGAAAGTTCTGTTCCGCAATGCTTAGATCTCATGAAATCTACAACCTCTTGTGTGAGAAAGTTCTTCC
AGAATCAACTTGCATCATGGTGAAAAATCTGGCCAGAAAGTTCTGAACTTGTCTAATTTCTTAACAGTTAGAAAAAATTTCTA
AGTGTTTAGAAATTTTGACTTTTCCAAGCAAACCTTGACTTTTGACTTCTTAATAAACAACCTTCTCATATTTCAACATGT
CTTGATGAAATGTGATCTTGAAATTTGATGTTGATGCAAAAGTCAAAGTTTGACTTTTCAGTGTGCAATTGACCAATTT
GCTCTGTGCCAATTTCCAAACCTAAATGTATGATGATCAGTGTGCAAACTTGATGTCATGGAAGATCTTATGAGAAAAATTC
TTGAAGACTGAGAGGAAAAATTTGTAGTACAAACACAAAGAAATCCTGTTTTTCATAGTCGGACTAGACACATTAACATAA
AACACCACTTCATTGGAAGAGTGATTGAAGAAGAAATGTCAGTTACCTTTCTGCAGTTCTAAGAGCAACTTACAGAC
ACTTTACTAAAACTACAAGAGGAAGATTTTAAACAACCTTAGAGAAGTAATGGGAGTTAAAGAGCAACACATTAAGGG
GGAGTGTTAAAAATTAATGTGTTGTAACCACTACCTTTAGTAAGTATTAAGAAAAATTTGTAATCATCACATTATAAT
TATTGTCCTTATTAAAAATATGATAAAGTTGTATCATTAAGATTGAGAAAAACCAATAGTCCTCGTCTTGATTTTGGAA
TTATTGTTTTCTATGTTACTTTTCTCAAGCCTATATAAAAACTTTGTAATGCTAAATTTGTAATGCTGGAAAAAATGTGT
AATGAATTCAATAGAAATTAATGGTATTTCAAAGTCCAAATCCATCAATAGAAATTTAGTACAAAAACGTAACCTCAAAAT
ATTCTCTTATTTAAATTTTACAACAATATAAAAAATATTCTCTTATTTTAAATTTTACAATAATAATTTATCACCTGT
CACCTTTAGAATACCAACAACAATATAACTTAGATATTTTATTTCTTAATAATTTTGAGATCTCTCAATATATCTGAT
ATTATTTTATATTTGTGCATATTTTCTTATGTTTAGAGTTAACCCCTTATATCTTTGTCACAACTAGTAATTTCAATATA
TGAGTTTGTGAAGGACACATTGACATCTTGAACATTTGGTTTTAACCTTGTGGAAATGTTAAAGGTAATAAACAATTCAG
AATTATGACCATCTATTAATATACTTCCCTTTGTCTTTTAAAAAAGTGTGCATGAAAAATGCTCTATGGTAAGCTAGAGTGT
CTTGCTGGCCTGTATATCAATTCATTTCCAGATTTCCAGAAACTGCCACTACGAATAATTAGTCATAAGACACGATG
TTAACACACAGTCCCCCTTGCAATGTTTTTTGCCATATATTCGGTCTCTTTCTTTTCTTCCAGTATAAAAACAATGAACATAAT

SBP - Samenprotein

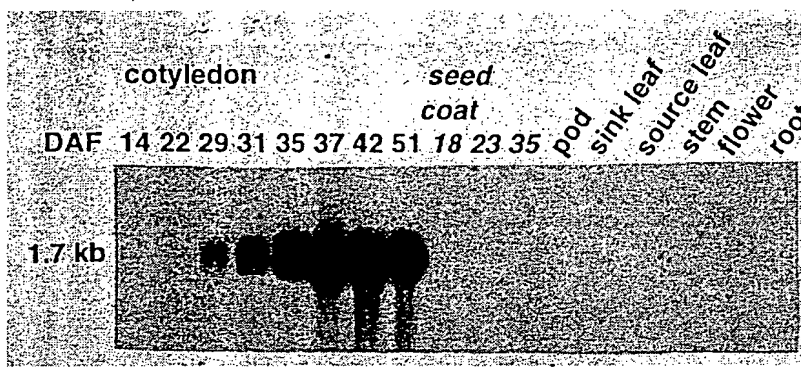
SBP - Samenprotein

TAATAGAGCGATCAAGCTGAACC

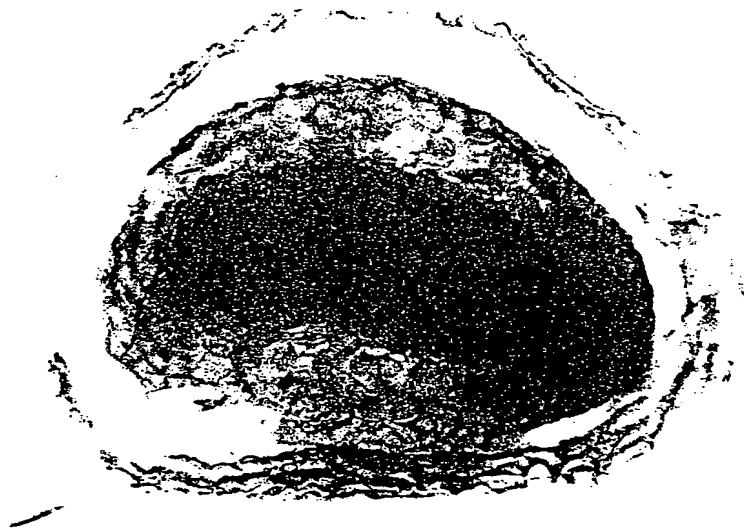
HindiII

NcoI	HindIII																				
ATG	CGG	ATT	AAA	ACA	AAG	CTT	TCC	TTA	ACC	ATC	TTT	CTT	TTC	TTC	CTC	TTA	GCT	TTA	CTA	TGC	
M	A	I	K	T	K	L	S	L	T	I	F	L	F	F	L	L	A	L	L	C	
																BamHI	XbaI	ocs term.			
TCA	AAC	TTA	GCC	ATA	GCC	AGA	AAA	GAA	AAG	GAC	GGG	ATC	CAT	CTA	GAG	TCC	TGC	TTT	AAT	GAG	
S	N	L	A	I	A	R	K	E	E	D	G	I	Q	L	E	F	C	F	N	E	
																SP					

Abb. 2

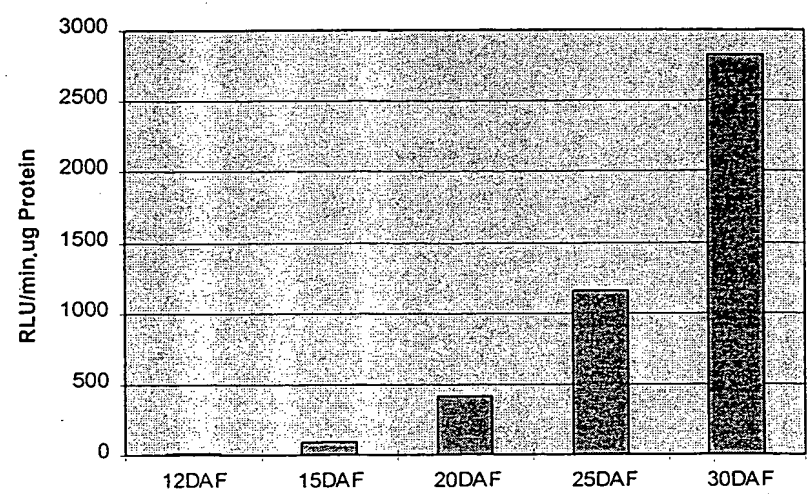


2a) Northern V.faba RNA gegen VfSBP20 Sonde,



2b) Schnitt durch reife transgene (SBPRGUS) Tabaksamen

GUS Gehalt in transgenen pSBPRGUS Tabak Linien (n=15)



2c)

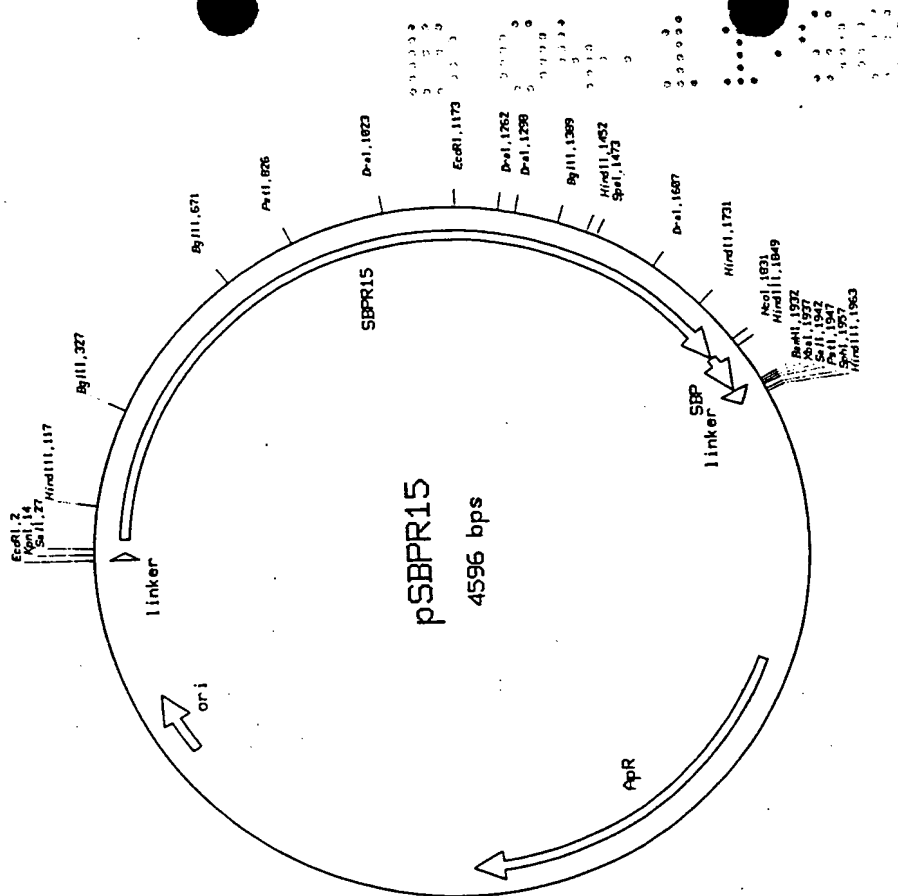
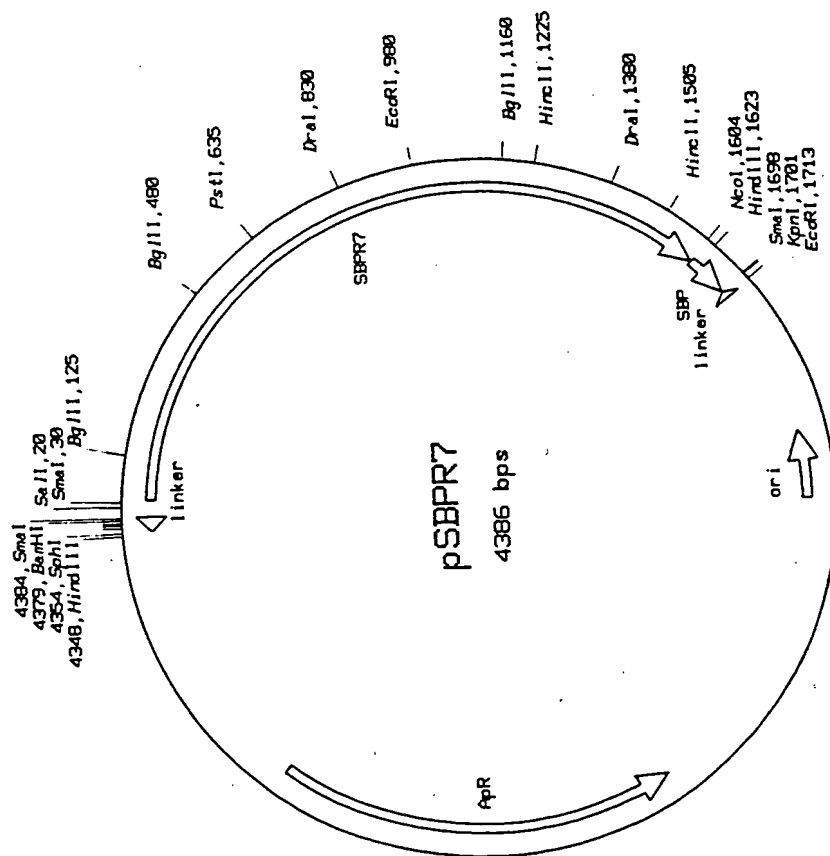


Abb. 3

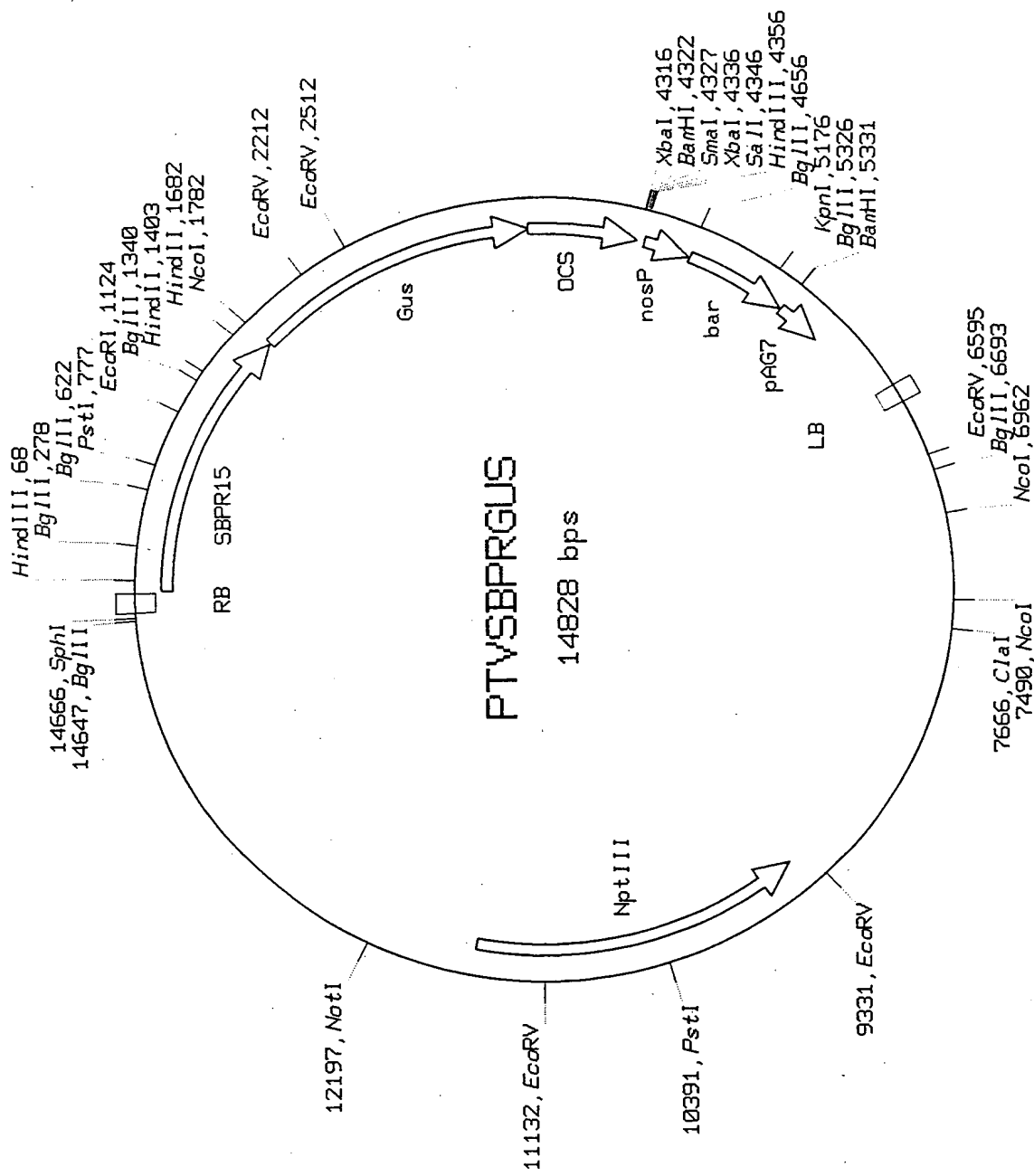


Abb. 4

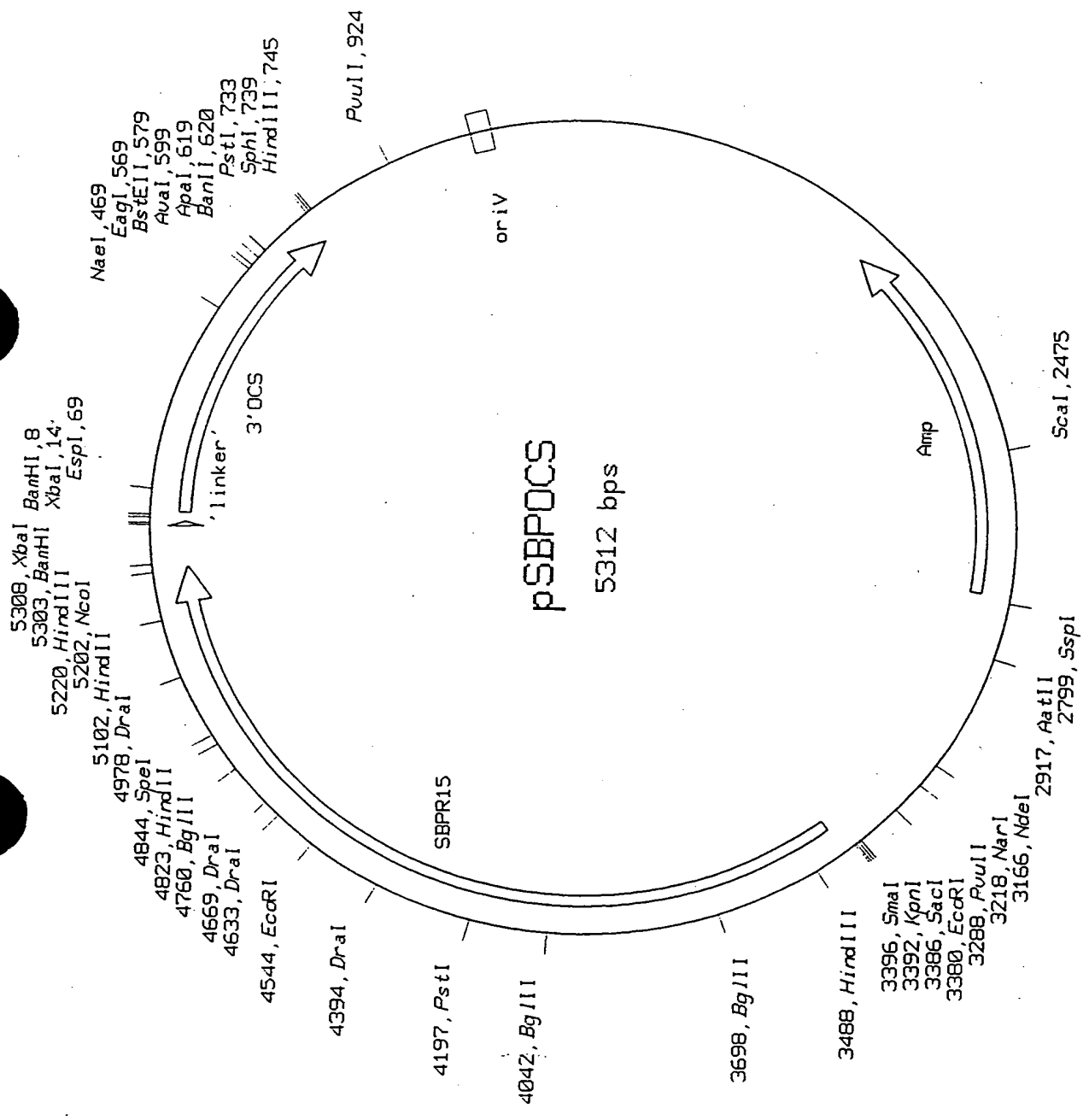


Abb. 5